

ホタルにおける NOS 遺伝子の進化および発現と発光との関連

著者	大槻 朝
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第175号
URL	http://hdl.handle.net/10097/51198

おおつき はじめ

氏名（本籍地）	大槻 朝
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第175号
学位授与年月日	平成22年3月25日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 (博士課程) 生態システム生命科学専攻
論文題目	ホタルにおける NOS 遺伝子の進化および発現と発光との関連
博士論文審査委員	(主査) 教授 河田 雅 圭 教授 田村 宏 治 准教授 千葉 聡

論文内容の要旨

ホタル (鞘翅目 Coleoptera ホタル科 Lampyridae)は世界に広く分布し、種間または種内の集団間で交配時のコミュニケーション方法が異なっている。特に発光を用いる型は各種で光り方が異なり、それを交配相手の認識に利用する。発光パターンと選好性の違いは交配前隔離に働いていると考えられ、ホタル科の進化を考える上で極めて重要である。ホタルの発光はルシフェラーゼ (luciferase)を触媒としてルシフェリン (luciferin)を酸化する化学反応 (ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応)で生み出される。ホタルの発光は化学反応そのものについては現在までに多くの研究がされてきたが、種間の明滅周期の違いをはじめとする多様な発光パターンを生み出す仕組みはまだ解明されていない。発光器での明滅制御に関わる要因の一つとしてはルシフェリンの酸化に使われる酸素が注目されるため、酸素の供給をどのように制御しているかについてはいくつかの研究がされている。その中でも本研究では一酸化窒素 (NO)により酸素の供給が制御されているという説に注目し、ホタル *nos* 遺伝子の配列および発現と発光との関連を確かめる実験を行なった。

ホタルの発光制御に NO の働きが関与している可能性が指摘されていたが、これまでホタル科では *nos* 遺伝子の配列は報告されてこなかった。そこでまず、ともに夜行性で周期的な発光を利用した配偶行動を行なうゲンジボタルとヘイケボタルで、*nos* 遺伝子の配列決定を行ないその進化的な特徴を考察した。ゲンジボタル *nos* 遺伝子のエクソンは 3399 塩基 (1133 アミノ酸相当)、ヘイケボタル *nos* 遺伝子は 3408 塩基 (1136 アミノ酸相当)の ORF で構成され、配列の長さの違いはあるがアミノ酸配列の相同性は約 92%と高かった。また、多重アラインメントを行なったところ、ホタルと他の昆虫種間での *nos* 遺伝子アミノ酸配列にも約 52~74%の高い相同性があった。特に高い相同性が確認されたのは、cofactor-binding domain に相当する領域である。これらは変異が生じた場合 NO 生成能力が失われるまたは変化する可能性があることがわかっている。各アミノ酸サイトにおける自然選択の検出の結果、負の自然選択が配列全体に確認され、特に cofactor-binding domain に負の選択サイトが多かった。昆虫では種によって NO が関連する様々な機能があることが知られ、*nos* 遺伝子のアミノ酸配列の違いが原因であることが予想されたが、この結果からは NOS の基本的な酵素機能に昆虫種間での違いはないと考えられた。一方で、*nos* 遺伝子による系統樹を作成すると、各目のまとまりは一般的な分類体系と良く一致するが分岐パターンは一致しない系統関係が得られた。このような系統関係となった原因として遺伝子重複による相同遺伝子の存在が考えられた。しかし、各種で独立に複数回の重複と喪失が起こるという稀な現象を想定しなければ説明できないこと、また *nos* 遺伝子は昆虫各種で 1 遺伝子座しか報告されていないことから、その可能性は非常に低い。種間で cofactor-binding domain は良く保存されていることから、他の領域が *nos* 遺伝子による系統樹の分岐パターンに影響していると考えられ、種間でアミノ酸配列による酵素機能の違いがあるのならこの領域に原因となる変異が存在している可能性が示唆された。

一酸化窒素 (NO)による酸素供給の制御により、発光明滅が生じるという説を検証するために、決定したホタル *nos* 遺伝子の配列情報を用い、発光と *nos* 遺伝子発現との関連を調査した。NO が発光を引き起こすことや NOS が発光器に存在していることは既に示され、発光反応では NO による酸素供給の制御があると考えられていたが、実際に発光時に NOS が使われているのかは現在までにどの研究でも確認されていなかった。そこでホタル *nos* 遺伝子の発現解析を行ない、発光と *nos* 遺伝子との関係の解明を試みた。そのため、種内に西日本型(2 秒型)、東日本型(4 秒型)といった配偶行動時に見られる飛翔発光の周期が異なる生態型が存在するゲンジボタル野外集団を用い、活動の状態が異なる各時刻および体の各部位での Real Time-PCR による発現量解析を行なった。周期的な発光のために NOS が必要ならば、配偶行動が活発な時間に近い 20 時の飛翔明滅時に *nos* 遺伝子の発現が多くなると予想したが、配偶行動が活発な時間に近い 20 時の飛翔明滅時の発光器における発現量を 5 つの集団で比較したところ、発光周期に対応した違いは確認されなかった(Fig 1)。また、飛翔発光中の個体で体の各部位の発現量を比較すると、頭部での発現量が他の部位より大きいことがわかった。さらに発光器での *nos* 発現量を飛翔発光時とそれ以外の時間の静止中とで比較したが、採集時間の違いによる有意な差はなかった(Fig 2)。また、連続的な弱い発光をするゲンジボタル幼虫やほとんど発光しないオバボタルでも *nos* 遺伝子は発光器での発現が確認された。これらの結果から、発光器においては、NO が発光明滅のためにより多く発現しているということではなく、NO による発光明滅に関わっていないか、発光時に使われるとしてもその量は他の部位に比べて特に多く必要ではないと考えられる。また、ゲンジボタルに NO を増減させる薬剤を与える実験も行ったが、NO 供与剤、除去剤のいずれを与えた場合も発光活動に変化は認められなかった。これら一連の結果、発光明滅が NO によって制御されている説を支持することができず、発光明滅には NO による酸素供給以外の機構が関係していると思われる。

周期的でない発光をするゲンジボタル幼虫でも体の各部位の *nos* 発現量を測定したところ、成虫とは逆に発光器での発現量が非常に大きかった。幼虫は周期的でない弱い発光をする他、発光器が未発達であることや水中生活をするといった違いが存在する。ゲンジボタル幼虫の発光には、形態および生息環境の違いから NO を多く使った酸素の取入れを行なっている可能性がある。また、昼行性でほとんど発光しないオバボタルの発光器における *nos* 遺伝子が発現していることから、発光器付近で NOS が発光以外の目的に使われる可能性がある。また、発光に関わるとすると、NO が発光器で多いことは周期的な明滅を生み出さず、発光を弱い連続的なものにするという効果を生じさせている可能性が考えられる。

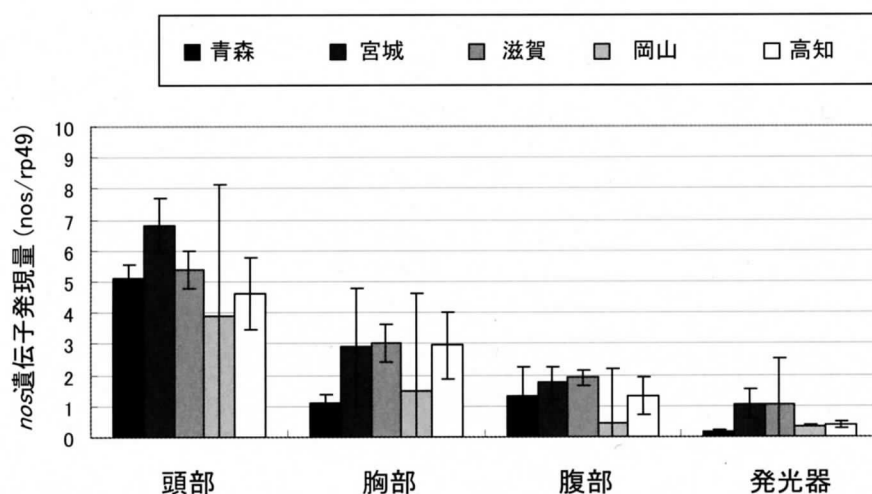


Fig 1. ゲンジボタル成虫各集団の、頭部、胸部、腹部、発光器における 20 時飛翔中の *nos* 遺伝子発現量。バーは標準偏差(S. D.)を示す。青森、宮城は東日本型(4 秒型)、滋賀、岡山、高知は西日本型(2 秒型)。

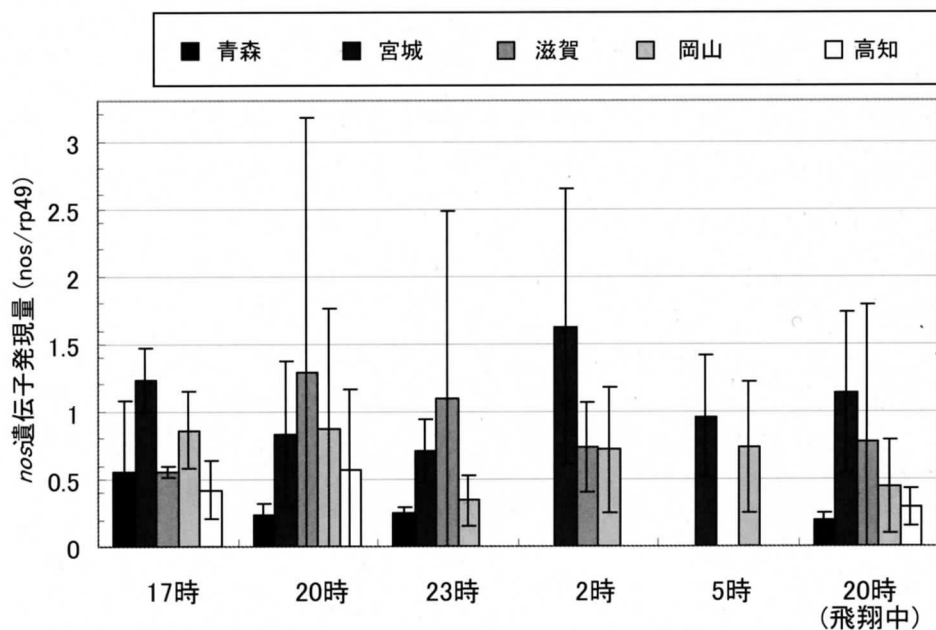


Fig 2. ゲンジボタル成虫各集団の、発光器における時刻ごとの *nos* 遺伝子発現量。17 時、20 時、23 時、2 時、5 時の静止中と 20 時の飛翔中の値を示す。バーは標準偏差(S. D.)を示す。青森、宮城は東日本型(4 秒型)、滋賀、岡山、高知は西日本型(2 秒型)。

論文審査結果の要旨

本研究は、ホタルの発光制御に NO が関係しているとする仮説を、ゲンジボタル、ヘイケボタル、オバボタルを用いて検証することを目的としている。一酸化窒素 (NO) による酸素供給の制御により、発光明滅が生じるという説を検証するために、決定したホタル *nos* 遺伝子の配列情報を用い、発光と *nos* 遺伝子発現との関連を調査した。NO が発光を引き起こすことや NOS が発光器に存在していることは既に示され、発光反応では NO による酸素供給の制御があると考えられていたが、実際に発光時に NOS が使われているのかは現在までにどの研究でも確認されていなかった。本研究では、ホタル *nos* 遺伝子の発現解析を行ない、以下の結果を得た。(1) 発光明滅しないオバボタルおよびゲンジボタル幼虫の発光器でも *nos* 遺伝子の発現が確認された。(2) ゲンジボタルでは、頭部での *nos* 遺伝子の発現がもっとも高く、発光器ではもっとも少なかった。しかし、幼虫では発光器での発現がもっとも高かった。(3) 発光の周期の違い、また明滅をもっともよく行う時間とそうでない時間帯で、*nos* 遺伝子の発現に違いはなかった。(4) ゲンジボタルに NO を増減させる薬剤を与える実験も行った。しかし、NO 供与剤、除去剤のいずれを与えた場合も発光活動に変化は認められなかった。これら一連の結果から、発光明滅が NO によって制御されている説を支持することができず、発光明滅には NO による酸素供給以外の機構が関係していると示唆された。

本研究は、NOS によるホタル発光制御の説を初めて検証したものであり、少なくとも NOS 遺伝子の発現がホタルの明滅に関与しているとする説を否定した結果となり、ホタル発光研究に重要な示唆をあたえるものである。したがって、大槻朝氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。